UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1934-1935

N° 246

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANALYTIQUE DE LA LIPÉMIE ET DE LA CHOLESTÉROLÉMIE

Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux

« Mention Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le Jeudi 6 Décembre 1934

PAR

Yvette-Georgette-Cécile GRAUPEAUD

Née le 3 Novembre 1908 à Richelieu (Indre-et-Loire).

Examinateurs de la Thèse

MM.	MAURIAC, professeur	*Président.*
	CHELLE, professeur	*Juges*
	LABAT, agrégé	
	VITTE, agrégé	

BORDEAUX

Imprimerie J. BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1934

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0010

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1934-1935

N° 246

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANALYTIQUE DE LA LIPÉMIE ET DE LA CHOLESTÉROLÉMIE

Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux

« Mention Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le Jeudi 6 Décembre 1934

PAR

Yvette-Georgette-Cécile GRAUPEAUD

Née le 3 Novembre 1908 à Richelieu (Indre-et-Loire).

Examinateurs de la Thèse :

MM. MAURIAC, professeur ..... *Président.*

CHELLE, professeur .... } *Juges*

LABAT, agrégé ..... }

VITTE, agrégé ..... }

BORDEAUX

Imprimerie J. BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1934

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Doyen ..... M. MAURIAC
Assesseur ..... M. GUYOT
Doyen honoraire ..... M SIGALAS

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. POUSSON, MOURE, W. DUBREUILH
RIVIÈRE, BARTHE, DENIGES, SELLIER, BEILLE, CASSAET, CHAVANNAZ, PACHON

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC. DUPÉRIÉ	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ROCHER
Clinique chirurgicale	BEGOUIN.	Clinique médicale des maladies des enfants	CRUCHET
Clinique chirurgicale et gynécologique	GUYOT.	Chimie biologique et médicale	DELAUNAY
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Physique médicale et pharmaceutique	SIGALAS.
Clinique d'accouchements.	ANDERODIAS.	Médecine coloniale et clinique des maladies exotiques	BONNIN
Anatomie pathologique et microscopie clinique	SABRAZES.	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	PETGES.
Anatomie	VILLEMIN.	Clin. des mal. des voies urinaires	DUVERGEY
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIH.	Clinique des maladies nerveuses et mentales	ABADIE
Hygiène	LEURET.	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Médecine légale et déontologie	LANDE	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale	RÉGHOU	Hydrologie thérapeutique et climatolcgie	CREYX
Chimie	CHEFLE.	Clinique dentaire	CAVALIE.
Botanique et matière médicale	GOLSE.		
Pharmacie	DUPOUY.		
Zoologie et parasitologie	MANDOUL.		
Médecine expérimentale	AUBERTIN.		
Clinique ophtalmologique	TEULIERES		

LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales).
PAPIN (Chirurgie générale). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale

AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.		MM
Anatomie	DUBECQ.	Chirurgie générale	CHARRIER. LOUBAT.
Anatomie	DUFOUR.		
Physiologie	FABRE.	Obstétrique	RIVIERE.
		Ophtalmologie	BEAUVIEUX
Médecine générale	DAMADE. PIECHAUD. DELMAS-MARSALET. DE GRAILLY FONTAN	Oto-Rhino-Laryngologie	DESPONS
		Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
		Physique médicale	WANGERMEZ
		Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	VITTE.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Physiologie	FABRE	Ophtalmologie	CABANNES (en congé
Médecine opératoire	PAPIN	Puériculture	FAUGERE
Accouchements	PERY.	Pharmacie chimique	VITTE
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes ..... MM. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA MERE

A MON PERE

Dont la tendresse, les soins et les encouragements n'ont cessé de m'être prodigués avec tant de sollicitude.

Faible témoignage de ma grande affection et de ma profonde reconnaissance.

A MES TANTES

A MES ONCLES

A MES COUSINS

A TOUTE MA FAMILLE

À Monsieur le Docteur NOIRCLAUDE

MÉDECIN COLONEL EN RETRAITE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE

Qui me prodigua ses soins éclairés avec tant de dévouement,

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur BARRÉ

DOCTEUR EN PHARMACIE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A Monsieur PAULIN

PHARMACIEN SUPÉRIEUR
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

MES MAITRES DE STAGE

C'est sous leurs auspices que débutèrent mes études en pharmacie.

Qu'à la fin de ces mêmes études, ils veuillent bien croire à toute ma gratitude.

A TOUS MES AMIS

A MES CAMARADES DE L'INTERNAT

A MES MAITRES

DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

A Monsieur le Professeur CHELLE

PROFESSEUR DE CHIMIE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A Monsieur le Professeur LABAT

PROFESSEUR DE TOXICOLOGIE ET D'HYGIÈNE APPLIQUÉE
PHARMACIEN-CHEF DES HÔPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A mon arrivée à la Faculté, ils me firent l'honneur de m'admettre à leur Laboratoire de Chimie.

Qu'ils reçoivent ici l'expression de mes respectueux sentiments.

A Monsieur le Professeur GOLSE

PROFESSEUR DE BOTANIQUE ET DE MATIÈRE MÉDICALE
DOCTEUR ÈS SCIENCES
PHARMACIEN DES HÔPITAUX
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A qui j'exprime ma plus vive gratitude pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

A Monsieur le Docteur DELAUNAY

PROFESSSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES
MEMBRE CORRESPONDANT DE LA SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Que je remercie de l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé et des conseils qu'il m'a donnés.

A Monsieur le Docteur DESQUEYROUX

A Monsieur le Professeur agrégé DAMADE

CROIX DE GUERRE

MÉDECINS DES HÔPITAUX
CHEFS DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE DE L'HÔPITAL SAINT-ANDRÉ

Qui m'ont permis d'effectuer dans leur laboratoire la plus grande partie de mes recherches.

Je leur en exprime mon plus vif remerciement.

A Monsieur le Docteur SERVANTIE

DOCTEUR EN MÉDECINE ET EN PHARMACIE
CHEF ADJOINT DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE
DE L'HÔPITAL SAINT-ANDRÉ
CROIX DE GUERRE

Il a bien voulu se charger de guider mes recherches.

Ses conseils, son amabilité et son enthousiasme m'encouragèrent grandement.

Qu'il croie à mes sentiments bien reconnaissants.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Docteur P. MAURIAC

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX
PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Après avoir eu l'honneur d'être interne dans son service durant deux années, ce fut pour moi un plus grand honneur encore qu'il voulût bien accepter la présidence de cette thèse.

Je suis très heureuse, aujourd'hui, de pouvoir lui témoigner, avec mes remerciements et mon admiration, ma plus profonde et plus respectueuse reconnaissance.

ERRATA

Il faut lire :

p. 21 : Colloïdo-pexique *au lieu de* : Colloïde pexique

p. 21 : Butenandt se référant, *au lieu de* : en référant

p. 35 : Na OH N/50, *au lieu de* : Ha OH N/50

p. 50 : 1 gr. 50 ‰, *au lieu de* : cholestérol %

p. 50 : Citrate de sodium 10 %, *au lieu de* : 10 ‰

p. 53 : $-\frac{E \times 1{,}50}{X}$ = q. en gr. ‰, *au lieu de* : q. en gr. %

p. 68 : Kamlet et Brooklyn, *au lieu de* : Hamlet et Brooklyn

Kanner, *au lieu de* : Hanner

Kanner et Chancogne, *au lieu de* : Hanner et Chancogne.

AVANT-PROPOS

Il est pour nous un devoir particulièrement agréable à remplir ici, et dont nous nous acquittons avec le plus vif plaisir : témoigner notre profonde reconnaissance à ceux qui nous guidèrent dans nos recherches et aussi à ceux qui nous aidèrent à la réalisation de ce travail.

Nous ne saurions trop remercier M. le docteur Servantie qui fut le guide éclairé et le conseiller quotidien, auquel, sûre du bon accueil qu'il nous réservait toujours, nous ne craignions pas de venir confier nos hésitations et, bien souvent nos déceptions, certaine à l'avance que son expérience et ses vastes connaissances biologiques auraient raison des difficultés auxquelles nous nous heurtions.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nos respectueux remerciements s'adressent également à la Sœur du laboratoire de Biologie qui, avec tant d'esprit et de cœur, n'a cessé de nous aider et de nous encourager au cours de notre travail. Son attitude, toute de patience et de dévouement, fut pour nous un exemple journalier au cours de cette année passée au laboratoire.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à MM. les Internes en Médecine, qui se sont mis à notre disposition avec la plus aimable complaisance, chaque fois que nous les avons sollicités.

Parmi nos camarades, que Mlle Nolibois et M. Pétard, Internes en Pharmacie, veuillent bien recevoir nos remerciements et l'assurance de notre vive sympathie.

INTRODUCTION

En consultant les publications, de jour en jour plus nombreuses, relatives à l'importance accordée aux substances lipoïdiques en biologie, nous avons constaté que l'étude expérimentale régulièrement suivie, du métabolisme de ces composés, était entravée par l'absence de techniques pratiquement utilisables.

Certes, les méthodes ne manquent pas, plus ou moins longues, plus ou moins coûteuses et pratiques; mais aucune de ces méthodes n'est vraiment clinique, si l'on entend par là des techniques simples, ne nécessitant que de faibles prises d'essai, relativement rapides, tout en restant suffisamment exactes.

L'étude expérimentale, pratiquée chez de petits animaux, nécessite des micro ou semi-micro méthodes de dosage utilisant peu de sang.

De même chez l'homme, il y a intérêt à pratiquer de nombreux dosages sur une même prise de sang.

Enfin de plus en plus, dans les laboratoires, afin de faciliter les recherches expérimentales, on utilise des techniques pouvant être pratiquées en série et permettant de mener de front plusieurs dosages.

C'est en essayant de mettre à notre actif le plus possible de ces avantages, que nous avons étudié des méthodes de dosage.

Après des essais infructueux, nous avons décrit ou contrôlé des techniques de dosage : des acides gras d'une part,

du cholestérol libre et estérifié d'autre part, techniques qui nous ont paru répondre au but que nous nous étions proposé.

Malgré toutes nos recherches, nous avons conscience du peu que nous apportons. Nous serions cependant heureuse, si les résultats de notre travail pouvaient faciliter celui du clinicien et du chercheur, désireux d'approfondir l'étude expérimentale des substances lipoïdiques.

CHAPITRE PREMIER

Sous le nom de **substances lipoïdiques**, on entend toutes les substances de l'organisme qui, par leurs propriétés physiques et chimiques et spécialement leurs solubilités, sont des graisses ou y ressemblent.

Parmi les « substances lipoïdiques », et conformément aux, décisions prises par la « Commission de réforme de la nomenclature de chimie biologique » (La Haye, juillet 1928), nous distinguerons :

Les Lipides Ternaires : ne renfermant dans leur molécule que du Carbone, de l'Hydrogène et de l'Oxygène.

Les Lipides Complexes ; qui renferment en outre du Phosphore, ou du Phosphore et de l'Azote.

I. **Les Lipides Ternaires** : sont subdivisés en :

1. *Glycérides* : Lipides qui proviennent de l'estérification du Glycérol par des acides gras.

Ce sont en général des triglycérides des acides gras qui résultent de la combinaison de trois molécules d'acides gras et d'une molécule de Glycérol.

Les acides gras qui prédominent sont les acides : Palmitique; Stéarique; Oléique.

2. *Cérides* : Lipides formés par l'union d'alcools supérieurs monovalents et d'acides gras de poids moléculaire en général élevé.

3. *Stérides* : Lipides dans lesquels l'alcool est un Stérol.

4. *Etholides* : Lipides formés par l'union de plusieurs molécules d'acides-alcools dans lesquels la fonction acide d'une molécule estérifie la fonction alcool d'une autre molécule.

II. **Les Lipides Complexes** comprennent :

1. *Phospholipides* : Lipides qui renferment du Phosphore (sous la forme de reste phosphorique).

2. *Phosphoaminolipides* : Lipides qui renferment à la fois du Phosphore (sous la forme de reste phosphorique) et de l'Azote (sous forme de reste aminé).

On les subdivise en :

a) Glycérophosphoaminolipides, dont l'alcool est le glycérol : *Lécithine, Céphaline.*

b) Sphyngophosphoaminolipides, dont l'alcool est la sphyngosine : *Sphyngomiéline.*

Les Cérébrosides ne possédant pas de fonction d'ester ne sont pas des lipides mais des « hétérosides ».

Parmi les « Lipides Ternaires » la classe des stérides mérite de retenir spécialement notre attention, en effet, comme nous l'avons déjà noté ce sont des lipides dont l'alcool est un stérol. Parmi les stérols, le plus répandu dans le règne animal est le cholestérol, alcool de poids moléculaire très élevé.

Le phytostérol et l'ergostérol sont de constitution très voisine de celle du cholestérol.

Des recherches récentes ont mis en évidence que le cholestérol est un mélange de deux ou plusieurs stérols différents par leurs points de fusion, leurs pouvoirs d'absorption des rayons ultra-violets, leurs pouvoirs de précipitation.

Le cholesterol peut être localisé sous la forme « libre » ou sous la forme d'« esters », soit dans le plasma, soit dans les hématies. Il faut tenir compte également des complexes du cholestérol et des protides, corps encore fort peu étudiés jusqu'ici.

L'existence du cholestérol sous la forme libre ou estérifiée entraîne des capacités fonctionnelles différentes. D'après Lambling (*Précis de Biochimie*), c'est au cholestérol libre que le cholestérol doit son rôle dans l'hydrophilie, de même dans les phénomènes d'hydrolyse. C'est, par contre, à la forme estérifiée, que Machebœuf accorde la propriété d'entrer en combinaison lipoprotidique.

Dans certains cas d'hypercholestérolémie, on a pu constater une augmentation du cholestérol total, sans qu'il y ait modification du rapport $\frac{\text{cholestérol libre.}}{\text{cholestérol estérifié}}$ Dans les affections hépatiques, ce rapport varie; ainsi dans l'ictère par rétention, il y a prédominance des esters du cholestérol.

Chez un grand nombre de malades du foie, contrairement aux sujets normaux, la teneur en cholestérol estérifié, est moindre que celle du cholestérol libre.

Tannhauser cite avoir rencontré des cas très graves d'atrophies hépatiques, dans lesquels la teneur en cholestérol total est fortement diminuée, alors que les esters du cholestérol disparaissent complètement.

Donc, dans toutes une série d'affections hépatiques graves, les proportions normales du cholestérol libre et du cholestérol estérifié se trouvent inverties et, cette inversion est en relation avec l'état de la fonction hépatique.

Tannhauser conclut : « Les modifications caractéristiques du sang, dans les maladies du foie, ne peuvent se déduire de la détermination du cholestérol total, mais *uniquement* du rapport : $\frac{\text{cholestérol libre.}}{\text{cholestérol estérifié.}}$ »

Grigaut et G. Laroche (21) engagent d'ailleurs à déterminer ce rapport, dont les variations n'ont été encore que fort peu étudiées en France.

Si certains ont prétendu que nos connaissances actuelles sur le métabolisme des substances lipoïdiques, en particulier des stérols, permettaient d'expliquer tous les phénomènes connus, nous nous en rapportons plus humblement au dire même de Peters et Van Slyke, qui jugent « pitifully meagre » nos acquisitions présentes sur un tel sujet.

Cependant, après Overton, les biologistes reconnaissent à la membrane cellulaire une nature essentiellement lipoïdique et, sans admettre comme cet auteur que les substances lipoïdiques conditionnent tous les échanges cellulaires, ce qui paraît excessif, il est actuellement reconnu que les subs-

tances lipoïdiques doivent jouer un rôle considérable dans les phénomènes biologiques.

1. *Ils paraissent remplir un rôle indiscutable dans les phénomènes de croissance et de nutrition* (28).

L'action de l'huile de foie de morue ne s'explique que par les substances lipoïdiques qu'elle contient.

« Si la vitamine A favorise l'accroissement de l'organisme, il existe des vitamines locales pour chaque organe, et ce sont ses lipoïdes » (Iscovesco, *P. Méd.*, 1922).

Les investigations de Hess, Rosenheim et Webster invitent à considérer les stérols à un nouveau point de vue.

Ces auteurs ont observé que le cholestérol irradié pouvait lutter contre le rachitisme chez le rat et chez l'homme; cette propriété qu'a le cholestérol de se transformer en principe antirachitique est due à la double liaison et au groupe alcoolique de sa molécule.

L'Ergostérol, qui possède trois doubles liaisons, est encore une « provitamine D », capable de devenir antirachitique par irradiation.

Il paraît inutile d'insister sur ce point montrant le grand voisinage de constitution des stérols et de certaines vitamines.

2. *Ils ont un rôle certain dans la narcose* (23).

3. *Ils paraissent jouer un rôle dans l'infection tuberculeuse* (23). (Calmette, Guérin, Massol).

4. *On attribue au cholestérol un rôle protecteur de la peau*, par suite de son pouvoir anti-hémolytique.

5. Le rôle du cholestérol paraît s'étendre encore plus, car il semble jouer *un rôle de défense dans les cas d'infection et d'intoxication.*

Ranson, montra que l'hémolyse par les substances vénéneuses de la série de la saponine est enrayée par le cholestérol, propriété due aux oxydryles alcooliques.

L'oxydryle libre du cholestérol peut former avec les saponines des composés d'addition qui ne se produisent plus, s'il y a eu estérification du groupe oxydryle.

De nombreux travaux parlent de l'antagonisme de lécithine et du cholestérol; dans bien des processus sériques et hémolytiques, la lécithine activerait ces phénomènes, le cholestérol au contraire les annihilerait.

6. Minovici a édifié toute une théorie par laquelle *le cholesterol préside au fonctionnement du tissu nerveux.* « Pas de cholestérol, pas de tissu nerveux », écrit-il.

Le cholestérol a un rôle protecteur, véritable isolant entre les fibres; les maladies mentales, pour lui, s'expliquent aisément; elles seraient le résultat de troubles dans la répartition du cholestérol autour des fibres nerveuses, d'où confusion des courants et confusion mentale.

Sans aller si loin, R. Collin et Florentin ont émis l'hypothèse, d'ailleurs appuyée sur des faits expérimentaux, d'une fonction colloïde pexique et hormonopexique des neurones possédant une forte charge lipidique.

7. Enfin, comme M. le professeur Mauriac le signalait récemment (48), « *les destinées du cholestérol de l'organisme paraissent autrement élevées, si l'on considère le coin du voile soulevé par certains chimistes* ».

Au Congrès du centenaire de la British Medical Association, tenu à Londres en juillet dernier, Marrian a formulé l'hypothèse que les hormones œstrogènes pourraient posséder le squelette fondamental du cholestérol et des acides biliaires (17).

Cette suggestion tirait toute sa vraisemblance du fait que les stérols et leurs dérivés sont les seuls composés chimiques du règne animal possédant un squelette carboné, constitué par des noyaux hexagonaux condensés.

Le même jour, Butenandt, en référant aux travaux de Rosenheim, King, Windaus et Wieland, exposa que : les hormones œstrogènes posséderaient le même squelette tétracyclique qui constitue la charpente fondamentale des stérols. Ceux-ci seraient la matière première avec laquelle l'organisme élaborerait la folliculine par deux séries de transformations distinctes :

a) Amputation de chaîne latérale par voie d'oxydation, avec formation du groupe carbonyle au point d'attache de cette chaîne;

b) Aromatisation du noyau porteur d'oxydryle qui, d'alcoolique, deviendrait phénolique.

L'activité œstrogène ne paraît d'ailleurs pas spécifique. On sait, depuis longtemps déjà, que certaines substances minérales, dont l'origine biologique ancienne est admise, possèdent une activité œstrogène considérable. C'est le cas de la houille, tourbe, asphalte, pétrole brut, etc...

Bref, cette propriété œstrogène appartient à un grand nombre de corps qui ont le caractère commun de posséder *le squelette fondamental du phénanthrène.*

En retenant la place capitale tenue par les stérols dans la constitution des substances œstrogènes, il paraît d'un intérêt nouveau de considérer le rapport des substances œstrogènes et des substances cancérigènes.

Cook, Doffs et Hewett qui ont préparé la première substance synthétique douée de propriétés œstrogènes, ont isolé du goudron de houille un carbure pentacyclique, le *benzopyrène*, capable de produire à faible dose le cancer du goudron par injection à la souris, eurent l'idée d'étudier ces substances, au point de vue de leurs propriétés œstrogènes. Les auteurs eurent la surprise de constater une réelle propriété œstrogène.

Il est troublant de rapprocher de ces découvertes le fait indiscutable que les tissus cancéreux renferment une teneur élevée de substances œstrogènes.

On peut ainsi se demander, avec Dodds et Cook, si la genèse des tumeurs malignes n'a pas quelque rapport avec une déviation du métabolisme, qui aboutirait à la production de ces substances aromatiques, fortement condensées, dont les propriétés néo-formantes sont si mystérieuses et qu'une simple déshydrogénation du cholestérol, accompagnée de cyclisation suffirait à produire. Or, nous savons que l'organisme est parfaitement capable de déshydrogéner dans certains cas

les noyaux cyclaniques des stérols, la folliculine en est un exemple.

Une notion nouvelle en est l'importance prise par les Pigments qui, eux aussi, se trouvent dans l'Insaponifiable.

Or, les *Pigments Caroténoïdes* en particulier, ont fait l'objet d'études chimiques approfondies. Un fait important à rapporter, est la découverte de leur relation avec l'*isoprène* (69).

Les travaux de Willstätter sont les premiers qui aient démontré que le nombre des atomes de Carbone dans la molécule des caroténoïdes est un multiple de ceux de l'Isoprène C^5H^8.

Grâce aux travaux de Kuhn, de Karrer et de leurs collaborateurs, les rapports des caroténoïdes avec l'Isoprène et avec le Phytol (produit intermédiaire de la Biosynthèse) sont établis; il en est de même pour ce qui concerne les terpènes et le caoutchouc.

L'Isoprène, dont les réactions sont d'une élasticité surprenante, est capable de se polymériser de trois façons différentes :

1. Par simple addition de ses molécules qui forment ainsi des terpènes.

2. Par une déshydrogénation et une polymérisation simultanées qui donnent du phytol.

3. Par une déshydrogénation et une polymérisation qui donnent des colorants polyènes.

Les caroténoïdes forment des esters avec les acides myristique, palmitique, stéarique, oléique, dans l'épiderme des fruits mûrs.

Les caroténoïdes remplissent donc ici la même fonction que le glycérol et les alcools monovalents de poids moléculaires élevés dans les substances lipoïdiques ordinaires.

Le tissu vivant peut donc synthétiser trois espèces de substances lipoïdiques :

1. Si des alcools incolores sont estérifiés par des acides gras incolores, on observe la formation de matières grasses. ordinaires, y compris les lécithines et les esters des stérols;

2. Si un certain acide coloré se combine avec du phytol, la synthèse de la chlorophylle est réalisée ;

3. Si des acides incolores forment des esters avec des alcools appartenant à la classe des caroténoïdes, des cires colorées apparaissent.

Ainsi, la classe des « Lipides ternaires » est beaucoup plus étendue qu'on ne le croyait il y a quelques années.

La synthèse des pigments a lieu dans le règne végétal, et les animaux trouvent les polyènes qui leur sont nécessaires, dans leur nourriture. Ainsi que l'a fait remarquer Zeichmeister, ces considérations conduisent au problème suivant : Quel est le rôle des caroténoïdes dans l'organisme des mammifères ?

On sait depuis longtemps que l'avitaminose A peut être guérie non seulement par l'huile de foie de morue, mais aussi par un régime riche en plantes vertes. D'après Steenbock, la substance curative doit être cherchée parmi les caroténoïdes végétaux ; d'après lui, le Carotène peut rétablir la croissance arrêtée chez de jeunes rats. Cette hypothèse fut d'ailleurs justifiée par les travaux de Karrer, von Euler et Kuhn.

D'après les expériences de Moore, on doit conclure : le *carotène est une provitamine.* Provitamine que les mammifères transforment aisément en vitamine A, laquelle leur est indispensable à leur développement et même à leur existence.

Quelle est la différence entre les vitamines et les hormones ?

D'après une opinion générale :

Les Vitamines ont une origine *exogène* ;

Les Hormones ont une origine *endogène.*

Les définitions de l'un et l'autre groupe doivent, en réalité, être révisées ; car les vitamines qui arrivent ainsi dans notre organisme, sous forme de provitamines, appartiennent par conséquent à la même classe biologique que les hormones.

De tout ceci, il se dégage une harmonie merveilleuse et l'on remarque que, de plus en plus, toute la vie terrestre forme une seule unité biologique indivisible.

Cependant, il faut reconnaître là, sinon uniquement des

vues de l'esprit, du moins un échafaudage d'hypothèses déjà partiellement fondées et qui sont, certes, fort attrayantes.

Il est un fait certain : actuellement, on se heurte à un barrage encore infranchi; tous les chercheurs ont l'intuition qu'autour du cholestérol réside la clef de bien des problèmes. Mais il est à prévoir qu'après ce piétinement momentané, le succès couronnera leurs efforts.

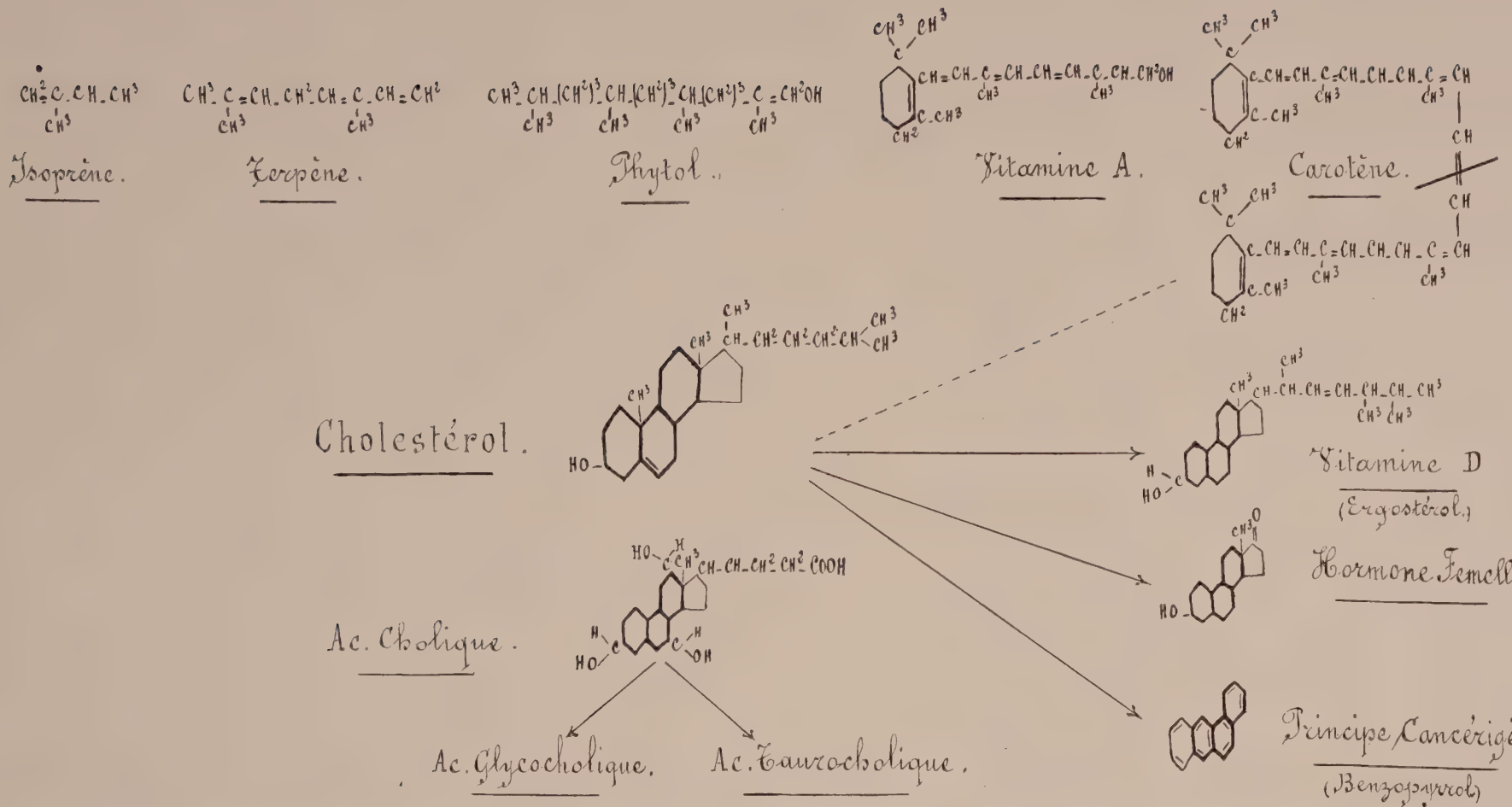
De plus en plus la chimie organique s'associe aux passionnants problèmes de biologie.

« Sans aller trop avant dans des régions trop nuageuses, sinon hypothétiques », nous pouvons cependant conclure, en signalant l'importance indiscutable de l'étude du métabolisme des substances lipoïdiques, des stérols et du cholestérol en biologie.

C'est afin de faciliter cette étude, que nous avons mis au point les techniques que nous proposons :

1. *Dosage des acides gras totaux* : Lipémie.
2. *Dosage du Cholestérol* : Libre; estérifié; total.

Laissant volontairement de côté l'étude du mode de dosage des « Lipides Complexes » qui font l'objet d'un travail actuellement en cours au Laboratoire de M. le professeur Mauriac·



Ce tableau résume les connaissances actuelles synthétisant les rapports chimiques prouvés, entre l'Isoprène, le Terpène, le Phytol, la Vitamine A et le Carotène, d'une part; le Cholestérol, la Vitamine D, l'Hormone Femelle, le Principe Cancérigène et les Acides Biliaires, d'autre part.

Il est de plus admis qu'il existe une parenté Chimique encore mal identifiée entre les Caroténoïdes et les Stérols.

CHAPITRE II

LA LIPEMIE

L'étude approfondie de l'échange des matières grasses est essentiellement entravée par l'absence d'une méthode appropriée, cliniquement utilisable, permettant de déterminer la teneur en acides gras d'une faible quantité de sang.

Aucune des méthodes utilisées jusqu'ici n'a donné entière satisfaction.

I. Etude critique des diverses techniques

Nous n'avons pas l'intention d'étudier, au cours de ce chapitre, les diverses méthodes qui ont été utilisées, avant d'exposer la technique que nous avons adoptée; il nous a pourtant paru nécessaire, pour donner les raisons de notre choix, de discuter, mais de façon générale, les procédés connus.

Nous classerons les diverses méthodes employées pour le dosage de la lipémie, en quatre grands groupes :

A. *Méthodes pondérales.*
B. *Méthodes par oxydation.*
C. *Méthode néphélométrique.*
D. *Méthodes acidimétriques.*

A. **Méthodes pondérales.**

1. *Méthode d'Adam.*

Cette méthode, parfois encore utilisée, permet de déterminer l'ordre de grandeur de la lipémie.

D'une technique relativement simple et ne nécessitant aucun réactif spécial, puisque ce n'est en somme que la technique usuelle du dosage du beurre du lait, elle peut rendre service dans un cas de dosage demandé à l'improviste. Elle demande autant de temps que la technique que nous avons l'intention de proposer.

Enfin, cette méthode nécessitant au moins 5, sinon 10 cc. de sang, ce qui est un gros inconvénient, ne répond pas au but que nous nous proposons d'atteindre, à savoir : la mise au point d'une technique précise et nécessitant peu de sang, susceptible de permettre des dosages en série, comme l'implique tout désir d'expérimentation.

2. *Méthode de Grimbert, Laudat et Weil* (22).

Nous ne ferons que citer, pour mémoire, le principe de cette technique qui permet à la fois le dosage des acides gras et du cholestérol.

Le cholestérol libre est séparé par précipitation au digitonoside; après élimination du digitonoside en excès, on procède à une saponification qui porte sur les esters du cholestérol, les substances lipoïdiques phosphorées et les graisses.

Les acides gras et le cholestérol libérés sont extraits, puis séparés par le digitonoside.

Dans le liquide résiduel, on dose le phosphore provenant de la décomposition des substances lipoïdiques.

Après addition des divers résultats, on obtient la teneur en acides gras totaux :

Ac. gras de la lécithine + ac. gras des éthers du cholestérol + ac. gras des graisses neutres + ac. gras préexistants.

Cette technique, fort longue et coûteuse par l'emploi du digitonoside, ne paraît pas répondre encore aux besoins de la clinique.

B. **Méthodes par oxydation.**

Principe. — Les acides gras, extraits du sang, sont oxydés dans des conditions convenables, par une solution titrée, en excès connu de dichromate de potassium en présence d'acide sulfurique.

L'excès d'acide chromique formé, non utilisé à l'oxydation, est titré iodométriquement.

1. *Méthode de Bloor. Modification du procédé de Bang.*

Cette méthode, qui s'avère précise, n'a pas encore trouvé d'application pratique dans l'analyse clinique quotidienne.

En effet :

a) Elle nécessite une prise d'essai de 3 à 5 cc. de sang ou plasma ;

b) Elle est longue et complexe ;

c) Elle utilise des réactifs qui nécessitent une purification.

2. *Modifications de la méthode de Bloor.*

Nombreuses furent les modifications de la méthode de Bloor ; parmi, nous citerons celles de : Staub (1931) ; Katsura Hatakeyama (1931) ; Rappoport et Engelberg (1932).

a) *Micro-méthode de Rappoport et Engelberg* (57). — Cette micro-méthode, qui détermine avec une grande précision les graisses totales sur 0 cc. 2 de sang ou de plasma, nécessite des réactifs purs et frais : ainsi, d'après les auteurs :

alcool
éther
chloroforme
éther de pétrole

} doivent être *purs* et *redistillés au moment du besoin.*

Cette technique se heurte donc là à des difficultés pratiques que seuls peuvent vaincre quelques laboratoires privilégiés pourvus d'une main-d'œuvre abondante.

b) *Méthode Katsura-Hatakeyama* (32). — Pour les mêmes raisons, la critique précédente est applicable à cette micro-méthode (0 cc. 5 de sang).

C. **Méthode néphélométrique d'après Bloor.**

Méthode Bloor-Pelkan et Allen (5).

Principe. — Cette méthode repose sur l'évaluation du louche produit dans une solution extractive d'acides gras par une solution d'acide chlorhydrique dilué, comparativement à une solution étalon traitée de façon identique.

Cette méthode, qui permet une séparation et un dosage du cholestérol et des acides gras sur une même prise d'essai, parait satisfaire les exigences de la clinique.

En réalité :

a) Elle nécessite un chloroforme rigoureusement *neutre*, *anhydre* et *sans trace d'alcool.*

Un tel produit ne peut être livré au laboratoire ; il est donc de toute nécessité de préparer au moment même du besoin du chloroforme en partant par exemple du chloral.

Cette raison seule suffirait à nous faire délaisser cette technique ; de plus :

b) Le degré de dispersion des substances lipoïdiques varie avec la température et avec les proportions des divers acides gras.

D. **Méthodes acidimétriques.**

1. *Technique de Stoddard et Drury* (1929).

Modifiée par *Evelyn B. Man* et *Edwin F. Gildea* (1932) (46).

Cette technique , qui paraît de prime abord répondre à toutes les objections théoriques, ne va pas sans difficultés pratiques.

a) Elle est longue (24 h.).

b) Complexe.

c) Nécessite des réactifs, *purs*, *essayés* pour chaque dosage et *fraîchement distillés*, comme les techniques par oxydation citées plus haut.

2. *Technique de Stewart et White* (1925).

Modifiée par *Himwich*, *Friedman*, *Mary Spiers* (1931) (25).

Cette technique acidimétrique, qui a également ses détracteurs et que, malgré tout, nous avons adoptée, nous a jusqu'ici donné entière satisfaction.

II. Etude de la méthode choisie.

RÉACTIFS :

1. Mélange alcool-éther, 3 parties d'alcool pour une partie d'éther.

2. Solution d'hydroxyde de sodium décinormale, très exactement titrée.

Nous avons tenu à préparer cette solution suivant la technique ci-dessous :

« Placer 100 à 500 grammes d'hydroxyde de sodium caustique dans un vase Pyrex contenant un poids d'eau égal à celui de l'hydroxyde de sodium. Refroidir le vase afin d'éviter un trop fort dégagement de chaleur. Vider ensuite le liquide dans un flacon paraffiné et bouché soigneusement avec un bouchon lui-même paraffiné. Si l'hydroxyde de sodium utilisé est légèrement carbonaté, ou si au contact de l'air il se carbonate tant soit peu, le carbonate de sodium formé, insoluble dans l'hydroxyde de sodium en solution aussi concentrée, tombe au fond du flacon. »

Le liquide surnageant peut être utilisé pour préparer la solution titrée d'hydroxyde de sodium.

Pour préparer un litre de solution d'hydroxyde de sodium décinormale, prélever 5 cc. 9 du liquide surnageant et étendre à 1.000 cc. avec *de l'eau distillée bouillie.*

Titrer ensuite la solution obtenue avec une solution d'acide

oxalique décinormale, en présence de phtaléine du phénol comme indicateur, et, en ayant soin de verser la solution d'hydroxyde dans la solution d'acide, car :

a) La solution alcaline prend moins de gaz carbonique que dans l'opération inverse ;

b) L'indicateur passe de l'incolore au coloré sans intermédiaire.

3. Solution d'acide chlorhydrique décinormale correspondant exactement à la solution précédente d'hydroxyde de sodium décinormale.

4. Solution d'hydroxyde de sodium cinquantinormale, préparée à partir de la solution décinormale au moment du besoin, et par petites quantités, afin d'éviter autant que possible, les variations de titre de solutions aussi diluées.

5. Alcool : Les auteurs font utiliser l'alcool absolu, mais nous avons utilisé, sans que cela nous crée aucune difficulté, l'alcool à 95°. En effet, si l'alcool à 95° est moins pur et plus acide que l'alcool absolu, l'essai à blanc, pratiqué à chaque dosage, remédie à ces inconvénients.

6. Solution alcoolique de phtaléine du phénol.

MATÉRIEL :

1. Des Erlenmeyer de 50 cc. Pyrex ;
2. Un ballon de 50 cc. jaugé et bouchant à l'émeri ;
3. Un entonnoir à filtration rapide ;
4. Pipettes de 5 cc., 10 cc., 15 cc. bien calibrées ;
5. Une pipette de 1 cc. fine et exactement calibrée.
6. Une micro-burette à extrémité très effilée contenant 2 cc. 5 et graduée en 1/100 de cc. ;

Nous avons utilisé la burette de Malmy, qui nous a permis de pratiquer nos dosages à la goutte près (1 goutte correspond à 1/100 cc.) (v. article de Malmy, *Bulletin Soc. Chim. Biol.*, décembre 1933).

7. Un bain-marie ;

8. Un bain de sable. Il nous a paru avantageux de pratiquer l'évaporation au bain de sable qui, convenablement chauffé, conserve longtemps une chaleur douce et qui permet d'évaporer sans crainte alcool et éther ;

9. Un petit réchaud électrique sert à amener le bain de sable à douce température;

10. Des filtres en papier, que nous avons eu soin de dégraisser à l'alcool bouillant et de manipuler à la pince, afin d'éviter toute trace de matières grasses.

Précaution indispensable. — Toute la verrerie doit être soigneusement nettoyée après lavage habituel, les traces de matières grasses doivent être entièrement évitées par passage de 24 heures dans l'acide sulfuriquee chromique. Rincer ensuite à l'eau distillée, sécher et conserver à l'abri des poussières.

Préparation de l'acide sulfurique chromique. — Dans un flacon contenant l'acide sulfurique, introduire peu à peu des cristaux de dichromate de potassium en excès. Celui-ci se dissout dans l'acide sulfurique jusqu'à saturation en produisant l'acide sulfurique chromique, utilisé pour le nettoyage de la verrerie comme nous l'avons indiqué ci-dessus.

TECHNIQUE.

Préparation. — Dans un Erlenmeyer de 100 cc., mesurer 35 cc. du mélange (1) alcool, éther. Ajouter goutte à goutte, et en imprimant au vase un mouvement de rotation continuel, 1 cc. de plasma (sang oxalaté centrifugé) exactement mesuré. Ceci afin d'obtenir un précipité finement divisé.

Extraction. — Plonger le vase dans un bain d'eau bouillante; le mélange est alors porté à l'ébullition, ébullition qui est maintenue quelques secondes.

Laisser refroidir ensuite à température de la pièce et filtrer sur filtre dégraissé, et préalablement humecté par la solution alcool-éther.

Le liquide est filtré dans un ballon jaugé de 50 cc.

Compléter ensuite à 50 cc. avec la solution (1) qui est versée sur le filtre dans un but de lavage.

Si l'on suppose que dans le plasma à étudier, la teneur en matières grasses est élevée (ceci si le dosage a déjà été prati-

qué, ou s'il s'agit d'un animal en expérience) l'exactitude est accrue :

soit en opérant sur 0 cc. 5 de plasma,

soit en étendant le liquide d'extraction à 100 cc. au lieu de 50 cc.

Boucher, agiter doucement.

Saponification. — Des parties aliquotes (15 cc.) de filtrat sont mesuréss dans des Erlenmeyer.

Mesurer d'autre part, et avec la même pipette 15 cc. du mélange alcool-éther, sur lequel sera pratiqué l'essai à blanc.

Les divers récipients sont placés sur un bain de sable, maintenu à douce température par le réchaud électrique.

Evaporer le contenu des Erlenmeyer à 1 cc. environ. Cette évaporation, qui ne nécessite pas une surveillance continuelle, demande cependant à n'être pas trop abandonnée ; car si elle va trop vite, des projections peuvent se produire, entraînant des erreurs.

Il y a, de plus, avantage à ne pas évaporer à sec, car par surchauffage, on peut entraîner des pertes et une décomposition des corps à doser.

Ajouter alors 5 cc. très exactement mesurés, avec une pipette fine et à deux traits, de solution d'hydroxyde de sodium décinormale. Après cette addition, on voit généralement apparaître un louche plus ou moins abondant, correspondant à la formation plus ou moins grande de savons de sodium.

Evaporer à nouveau la mixture, en prenant les mêmes précautions que précédemment, jusqu'à 1 cc. environ.

Il est prudent de ne pas chauffer trop vite à ce temps du dosage, car alors, le liquide a tendance à monter le long des parois; une petite habitude a vite raison de cette difficulté.

Afin de compléter la saponification, ajouter 5 cc. d'alcool. Evaporer à 2 cc. environ.

Acidification. Libération des acides gras. — Ajouter alors 5 cc. de solution d'acide chlorhydrique décinormale très exactement mesurés.

(Il y a intérêt à utiliser pour cela la pipette qui a servi à l'addition de solution décinormale d'hydroxyde de sodium après le lavage et séchage à l'étuve ou à la trompe.)

Cet acide neutralise exactement l'alcali et libère les acides gras. Le liquide conserve alors un aspect plus ou moins opalescent dû à la présence des acides gras.

On peut même constater qu'il paraît y avoir un rapport entre la teneur du plasma en acides gras et l'opalescence du liquide à ce stade du dosage.

Le mélange est alors bouilli et réduit à la moitié, afin de libérer le gaz carbonique absorbé.

Titrage. — Après addition de 10 cc. d'alcool, la solution est chauffée et titrée, encore chaude, à l'aide de la microburette de Malmy, par la solution d'hydroxyde de sodium cinquantinormale, en présence de la solution de phtaléine du phénol.

CALCULS :

1 cc. de plasma est dissous dans 50 cc. d'alcool-éther; la prise d'essai est de 15 cc., ce qui correspond à :

$$\frac{1}{50} \times 15, \text{ soit } 0 \text{ cc.},3 \text{ de plasma.}$$

Soit X, le nombre de cc. de solution NaOH $N/50$ utilisé pour le dosage;

Soit x, le nombre de cc. de solution HaOH $N/50$ utilisé pour l'essai à blanc.

$$\frac{(X - x)}{0,3} \times 5,38 = q.$$ grammes d'acides gras pour 1.000 cc. de plasma exprimés en tripalmitide.

5,38 = coefficient de la tripalmitide.

Soit encore :

$(X - x) \times 17,93 = q.$ grammes d'ac. gras pour 1.000 cc. de plasma, exprimés en tripalmitide.

Calcul du coefficient de la tripalmitide

Formule de la tripalmitide :

$$\begin{array}{l} CH^2 - O - (CO - C^{15}\,H^{31}) \\ | \\ CH - O - (CO - C^{15}\,H^{31}) \\ | \\ CH^2 - O - (CO - C^{15}\,H^{31}) \end{array}$$

$$C = 12{,}05\,;\ H = 1\,;\ O = 16 —$$

$$C^{51}\,H^{98}\,O^6 = 808$$

$$\frac{808}{3 \times 50} = 5{,}38$$

Après cet exposé détaillé de la technique que nous proposons, il nous paraît utile d'en faire un résumé tel que l'expérimentateur désireux de l'utiliser ait rapidement une vue d'ensemble de la méthode, en même temps que les points de détail essentiels pour la pratiquer.

1. *Préparation.* — Dans un Erlenmeyer, mesurer :

35 cc. alcool-éther,

ajouter 1 cc. de plasma.

2. *Extraction.* — Porter à l'ébullition, quelques instants, refroidir, filtrer, compléter à 50 cc., agiter.

3. *Saponification.* — Prélever 15 cc. du liquide d'extraction dans un Erlenmeyer.

Prélever 15 cc. du mélange alcool-éther dans un autre Erlenmeyer;

Evaporer au bain de sable à 1 cc.;

Ajouter dans chaque vase 5 cc. de solution d'hydroxyde de sodium décinormale;

Evaporer à 1 cc.;

Ajouter 5 cc. d'alcool.

Evaporer à 2cc.

4. *Acidification.* — Libération des acides gras.

Ajouter 5 cc. de solution d'acide chlorhydrique décinormale ;

Laisser bouillir et réduire à moitié.

5. *Titrage.* — Ajouter 10 cc. d'alcool ; Chauffer et titrer les liquides encore chauds, par la solution NaOH $N/50$.

X = nombre de cc. solution NaOH $N/50$ utilisés pour le dosage ;

x = nombre de cc. solution NaOH $N/50$ utilisés pour l'essai à blanc.

$(X - x) \times 17{,}93 = q$. grammes d'acides gras pour 1.000 cc. en tripalmitide.

Substances gênantes. — Les auteurs signalent que des traces d'acides lactique, butyrique, ou leurs sels de sodium, l'acétone, gênent le dosage.

Examen critique de cette méthode

CRITIQUE ;

E. B. Man et E. F. Gildea prétendent que ce mode de dosage est erroné par « l'addition de quantités relativement considérables d'alcali et d'acide ».

De plus, elles pensent que le résultat du dosage peut être surélevé par suite de l'action de l'alcali sur le glucose extrait du plasma par la mixture éthéro-alcoolique, qui donne alors naissance (glycolyse alcaline) à des acides non gras, qui se trouveraient ensuite dosés au même titre que ces derniers.

Aussi rapides que soient ces modifications, elles ne peuvent réellement pas se produire, étant donné la courte durée de dosage et le peu de temps pendant lequel l'alcali agit sur le mélange.

D'ailleurs, Man et Gildea proposent une méthode acidimétrique qui paraît très précise et qui semble leur donner des résultats intéressants ; cependant, au cours de la saponification, il leur faut ajouter une solution d'hydroxyde de sodium beaucoup plus concentrée que celle que nous utilisons, ainsi que l'acide chlorhydrique concentré ; nous voyons

donc encore là une preuve que ces additions sont sans aucun effet sur le résultat du dosage.

En tout cas, aussi fondées que paraissent ces critiques, nous ne pensons pas qu'elles suffisent pour condamner une technique qui présente des avantages pratiques particulièrement précieux.

AVANTAGES :

1. *Prise d'essai de* 1 cc. — Dosage praticable sur plasma, sérum ou sang total; mais il y a intérêt à opérer sur le plasma les globules rouges pouvant entrainer des erreurs.

2. *Avantage de l'essai à blanc*, qui permet de soustraire l'acidité provenant de l'alcool.

3. *Utilisation d'une solution cinquantinormale d'hydroxyde de sodium*, qui permet une précision suffisante.

4. *La burette de Malmy*, contribue à donner au dosage toute la précision qui peut lui être demandée.

5. *Cette méthode est simple*, elle ne nécessite aucun réactif spécial qu'un laboratoire courant n'ait à sa disposition; s'il est intéressant d'avoir de l'alcool et de l'éther aussi neutres que possible, cela n'est pas indispensable, étant donné l'essai à blanc. On peut donc mettre en train cette méthode sans purification spéciale, opération toujours longue et délicate.

6. *Elle est rapide*, puisqu'elle permet d'effectuer un dosage en deux heures tout au plus.

7. *Elle permet enfin de pouvoir pratiquer aisément une expérimentation*, puisqu'elle permet *des dosages en série.*

Résultats

Avant d'adopter cette technique, nous nous sommes proposé de l'éprouver, en partant de solutions d'acides gras de titres connus.

1. Solution d'acide oléique : 340 mgr. pour 100 cc. alcool-éther.

1re prise d'essai: 5 cc.....	372 mgr. %
2e prise d'essai : 10 cc.....	386 mgr. %
3e prise d'essai : 15 cc.	337 mgr. %

2. Solution d'acide palmitique : 160 mgr. pour 100 cc alcool-éther.

1re prise d'essai : 5 cc.	163 mgr. %
2e prise d'essai : 10 cc.	166 mgr. %
3e prise d'essai : 15 cc.	167 mgr. %

3. Solution d'acide margarique : 190 mgr. pour 100 cc. alcool-éther.

1re prise d'essai : 5 cc.	187 mgr. %
2e prise d'essai : 10 cc.	183 mgr. %
3e prise d'essai : 15 cc.	190 mgr. %

Ces résultats semblent tout à fait en accord avec ceux retrouvés par les auteurs. Ainsi, dans des essais analogues, voici quelques chiffres qu'ils nous signalent :

Titre des solutions en expérience	*quantité retrouvée*
Solution d'acide Palmitique à 888 mgr. %....	900 mgr. %
Solution d'acide oléique à 240 mgr. %	236 mgr. %
Mixture extrait plasmatique + ac. oléique + acide palmitique 376 mgr. %.....	400 mgr. ...

Cette technique adoptée, nous a servi à déterminer quelques chiffres de la lipémie chez l'homme et chez le lapin, dans des cas normaux, pathologiques ou expérimentaux.

Chez l'homme :

	1re *prise d'essai en gr. ‰*	2e *prise d'essai en gr. ‰*	3e *prise d'essai en gr. ‰*
	4,482	4,482	—
(*a*)	8,965	8,965	—
	2,510	2,510	2,530
(*b*)	14,792	14,702	—
	5,020	5,020	5,163
	6,096	5,916	6,096
	3,406	3,406	—
	5,199	5,379	—
(*c*)	9,329	9,502	9,329
	6,096	5,737	5,872
	4,661	4,572	4,661
	7,709	7,551	7,709
	5,199	5,020	5,199
	6,804	7,082	6,804
(*d*)	12,371	12,371	12,191
(*e*)	12,192	12,013	12,013
	4,661	4,661	4,572
	4,482	4,482	4,482
	4,482	4,572	4,482

(*a*) — néphrite chronique avec azotémie légère et rétention chlorurée.

(*b*) — ascite chyleuse.

(*c*) — néphrite.

(*d*) — néphrose lipoïdique

(*e*) — néphrose lipoïdique.

Chez le lapin :

1re *prise d'essai en gr. ‰*	2e *prise d'essai en gr. ‰*	3e *prise d'essai en gr. ‰*
8,158	8,247	8,199
2,510	2,510	2,430
6,634	6,634	6,554
3,944	3,944	3,865
55,583	55,583	55,403
19	18,64	18,820
6,710	6,98	6,98
9,860	9,50	9,50
6,275	6,265	6,27
7,060	7	7,10

Nota. — Les chiffres élevés trouvés chez le lapin correspondent à des sérums d'animaux soumis à une absorption quotidienne d'huile cholestérolée. Le résultat de 55 gr. a été obtenu sur un sang prélevé quelques instants après l'ingestion par tubage gastrique de 20 centimètres cubes d'huile cholestérolée à 2 %.

Valeurs normales. — La teneur en acides gras totaux pour des individus normaux, oscille :

pour l'homme : de 4 gr. 50 à 4 gr. 80;

pour le lapin : de 4 gr. 50 à 4 gr. 90 par litre.

CHAPITRE III

LA CHOLESTEROLEMIE

Etant donné l'intérêt persistant de la question, et nous orientant toujours vers le même but, il nous a paru intéressant de faire une rapide étude critique des divers modes de dosage de la cholestérolémie, avant l'étude détaillée d'une technique pratique n'utilisant qu'une faible quantité de sang et permettant, avec l'aide de la lipémie et de la lécithinémie, une étude complète du métabolisme des substances lipoïdiques.

I. Etude critique des diverses méthodes

A ce sujet, nous ne ferons que rappeler l'étude faite par Khalyl; parmi les principales techniques actuellement en cours, nous citerons :

A. *Méthode pondérale de Windaus.*

Elle utilise la formation en milieu hydro-alcoolique et à chaud, d'un complexe défini cholestérol-digitonoside, qui est pesé après lavage et dessication.

Outre sa précision, cette méthode présente l'avantage de séparer le cholestérol libre, qui, seul, participe à la formation du complexe cholestérol-digitonoside et le cholestérol estérifié.

Nombreuses sont les variantes de la méthode primitive de Windaus, qui en diffèrent, soit par le mode d'extraction; soit par les conditions d'obtention du précipité cholestérol-digitonoside.

Signalons en particulier :

1. *Modification Grimbert-Laudat et Weil*, qui, après une longue extraction, dans l'appareil de Kumagawa, permet de doser en même temps, la teneur en acides gras et en cholestérol.

2. *Modification de Caminade* (9).

Utilisant un solvant différent : Eau, Alcool, Acétone (E. A. C.).

3. *Modification Laborde et Enver* (35).

Modification portant sur le mode d'extraction et de saponification.

4. *Modification de Khalyl* (33).

Voisine de la précédente.

Cette dernière technique présente certes un intérêt indiscutable ; mais, comme toutes les techniques pondérales précitées, elle nécessite 10 centimètres cubes de sérum ou de plasma et la durée du dosage est telle qu'aucune méthode pondérale ne peut répondre au but que nous nous proposons.

B. *Méthode colorimétrique de Krastelewsky* (34).

Méthode utilisant, en vue de dosage colorimétrique, la réaction colorée de Salkowsky (coloration rouge obtenue par action de l'acide sulfurique sur la solution extrative de cholestérol). Mais étant donné les précautions à prendre pour que la coloration ne soit pas entachée d'erreur, étant donné les variations d'intensité des colorations, nous ne nous sommes pas arrêtée à cette méthode.

C. *Méthode colorimétrique d'Obermeyer et Milton* (1933) (52).

Ces auteurs ont mis au point une micro-méthode de dosage basée sur la coloration de Bernouilli.

Dans une publication récente (1932), Bernouilli a observé

que la réaction de Tschugaew (1909) est applicable à la fois au cholestérol libre et au cholestérol estérifié.

Cette réaction consiste à faire agir du chlorure d'acétyl sur une solution de cholestérol dans l'acide acétique glacial, en présence de chlorure de zinc. Il se développe au chauffage une coloration, qui, finalement, vire au brun doré.

Après modification de la coloration et mise au point de la technique, Obermeyer et Milton ont publié ce nouveau mode de dosage, qui est fort long, et qui nécessite, pour la séparation des divers cholestérols, l'utilisation d'une solution de digitonoside, dont l'emploi fort coûteux ne peut être répandu dans les laboratoires d'expérimentation.

D. *Méthodes de Grigaut* (19).

1. Nous ne ferons que rappeler sa *méthode pondérale*, sans intérêt pour nous, puisqu'elle nécessite 20 centimètres cubes de sérum, et nous nous arrêterons seulement à sa méthode colorimétrique d'un usage courant.

2. *Méthode colorimétrique.* — Ce mode de dosage est basé sur la réaction de Liebermann, coloration verte obtenue en traitant une solution extractive chloroformique de cholestérol par l'anhydride acétique et l'acide sulfurique..

La **réaction de Liebermann** a fait l'objet de nombreuses études particulières dans le but de déterminer les conditions favorables au développement normal et régulier de la couleur, base du dosage.

Nous ne ferons que rappeler les conclusions du travail de Khalyl (33).

a) La réaction doit s'effectuer *dans un matériel sec, avec des réactifs rigoureusement anhydres.* Griffon (18) a montré que des traces d'eau suffisent pour modifier la vitesse de la réaction; ainsi une quantité infime d'eau suffit à faire virer le vert au jaune pâle, en produisant en quelque sorte une accélération du processus normal d'évolution de la teinte.

b) Les conditions d'éclairage sont également fort importantes.

Le dosage colorimétrique doit se faire à l'obscurité.

La réaction de Liebermann sert de base à deux groupes de méthodes de dosage : macro-méthodes, micro-méthodes.

I. Macro-méthodes.

a) Dosage du Cholestérol Total. Technique Grigaut.

Cette technique, d'une pratique courante dans tous les laboratoires, comprend deux temps :

Extraction du Cholestérol. — Celui-ci est extrait par l'éther, après destruction par l'alcool sodé à 1/200, des combinaisons plus ou moins lâches qu'il forme avec d'autres substances lipoïdiques.

La solution éthérée est alors évaporée.

Coloration. Dosage. — Le résidu est repris par le chloroforme. Sur la solution chloroformique, la réaction de Liebermann est alors pratiquée.

Le rôle de l'alcool sodé est longtemps resté obscur. D'après les travaux de Machebœuf (41), il semble qu'il ait réellement pour but de détruire une « adhésion » particulière du cholestérol sur les protides et autres lipoïdes du sérum, mettant ainsi en liberté une partie du cholestérol qui y est contenu.

Cette façon de voir est encore fortement discutée ; d'ailleurs, d'autres méthodes, par nous utilisées et ne comportant pas ce temps à l'alcool sodé, nous ont donné des résultats en tous points superposables aux résultats obtenus par la méthode de Grigaut.

b) Dosage du cholestérol estérifié. Technique Grigaut (20).

Après extraction du cholestérol total, le cholestérol libre est précipité dans des conditions convenables par le digitonoside ; le cholestérol restant et correspondant au cholestérol estérifié, est dosé par la réaction de Liebermann.

Extraction. — Dans un cholestérimètre, placer 2 centimètres cubes de sérum sanguin en nature, de manière à ce que la teneur en cholestérol total n'excède pas 2 gr. 50‰

Extraire ensuite à l'éther sulfurique selon la manière habituelle. Laver à l'eau.

Evaporer la solution éthérée au B. M.

Le résidu contenu dans la capsule encore chaude est repris par 5 centimètres cubes du mélange E. A. C. de Caminade (eau 18, alcool 9, acétone 73) et replacé quelques minutes au B. M. afin d'assurer la dissolution.

Ajouter alors 3 centimètres cubes de solution de digitonoside à 0 gr. 50 % dans le solvant E. A. C. Mélanger. Laisser en contact 10 minutes; filtrer sur papier.

Le complexe cholestérol digitonoside, séparé sur le filtre, est lavé à deux reprises avec quelques centimètres cubes d'éther ayant servi préalablement à rincer la capsule. Les solutions de filtration et de lavage sont évaporées et le résidu est repris par 5 centimètres cubes de chloroforme.

Dosage. — Sur le liquide d'extraction chloroformique, la réaction de Liebermann est alors pratiquée et le dosage est effectué.

Ch. Total — Ch. Estérifié = Ch. libre.

c) Dosage du cholestérol libre. Technique O. Kanner (30).

Récemment, O. Kanner propose un dosage direct du cholestérol libre; il utilise pour cela l'éther de pétrole aux lieu et place de l'éther sulfurique et, suivant la technique de Grigaut, pour le cholestérol total; il recommande seulement *une forte agitation.*

Kanner, à la suite de Bang, a montré que l'éther de pétrole n'extrait que du cholestérol libre (30).

En effet :

Le produit entraîné est entièrement précipitable par le digitonoside.

Le liquide filtré, séparé du complexe et de l'excès de digitonoside, ne donne pas la réaction de Liebermann.

Dans une note récente de la Société de Biologie, Grigaut

critique la technique de Kanner, en exprimant que cette méthode fournit des résultats « voisins de la valeur théorique » et erronés; seul, ajoute-t-il, le mode de séparation au digitonoside du cholestérol libre et du cholestérol estérifié, peut donner satisfaction.

Kanner réplique, en démontrant par une étude approfondie de l'extraction à l'éther du pétrole, que :

L'éther de pétrole contient tout le cholestérol libre; et seulement le cholestérol libre.

Khalyl a repris les expériences de Kanner et conclut comme Bang :

Nous avons vérifié que, non seulement l'éther de pétrole extrait le seul cholestérol libre, mais qu'il peut l'extraire en totalité. »

Pour notre part, nous ne ferons qu'appuyer dans ce sens, les expériences faites par nous, ne faisant que confirmer ces données.

Quant à la critique faite par Kanner à Grigaut (31), relativement à son mode d'extraction du cholestérol estérifié, après la séparation au digitonoside, nous ne pourrons que la renforcer, ayant nous-même constaté que la coloration obtenue en fin de dosage est souvent gênée par une surcoloration jaune, qui provient de la présence du digitonoside, forcément entraîné au cours de l'extraction.

d) Velluz (63).

Préfère déterminer directement le rapport : $\frac{\text{ch. estérifié}}{\text{ch. total.}}$

Après une extraction éthéro-alcoolique, il détermine :

Le cholestérol total. Technique Grigaut.

Le cholestérol estérifié, après séparation du cholestérol libre par le digitonoside.

Toutes ces macro-méthodes utilisent trop de sang, sérum ou plasma, pour répondre au but que nous nous proposons.

II. Micro-méthodes.

a) Extraction a chaud. — Ayant réalisé la technique de Leiboff (37), en vue d'obtenir le dosage du cholestérol total, étant donné de plus, l'étude de l'extraction du cholestérol libre et du cholestérol estérifié, nous avons mis au point une micro-méthode de dosage du : *cholestérol total, du cholestérol libre* et *du cholestérol estérifié.*

Matériel. — Après plusieurs essais infructueux, nous avons réussi à établir un appareil simple tel que tout laboratoire puisse facilement se le procurer. Cet appareil qui n'est qu'une modification de l'appareil de Leiboff comprend :

1. Un tube cylindrique en verre Pyrex, pourvu à la base d'une partie cylindrique plus étroite, aboutissant à une boule (voir *fig.* 1) (tube type Folin et Wu).

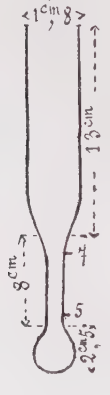


fig. 1.

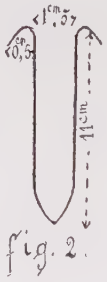


fig. 2.

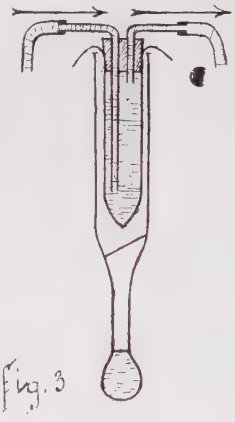


fig. 3

Ce tube porte deux traits de jauge, à 5 centimètres cubes et à 7 centimètres cubes, dans la partie cylindrique la plus étroite.

2. Un tube intérieur cylindrique, en verre Pyrex, à fond conique et dont le rebord est muni d'une sorte de collerette telle que ce deuxième tube entrant dans le premier, la collerette recouvre et dépasse le rebord du tube extérieur (voir *fig.* 2). Ce tube intérieur sert de réfrigérant (le rôle de la collerette sera exposé au cours de la description de la technique).

3. Un bouchon en caoutchouc percé de deux trous et un bouchon s'adaptant au tube intérieur.

Des tubes recourbés passés dans ce bouchon et munis de caoutchouc permettent le passage d'un courant d'eau froide (*fig.* 3).

4. Un bain-marie dans lequel plonge cet ensemble, complète l'appareil.

Ce bain-marie peut d'ailleurs être facilement réalisé. Pour nous, une simple boîte cylindrique en métal et dont le couvercle est percé de trous de diamètre convenable , a parfaitement suffi.

5. Un réchaud électrique sert à maintenir le B. M. à température convenable.

La technique nécessite également :

Un bain de sable;

Des rondelles de papier Chardin d'environ 1 cm. 5 de diamètre, préalablement dégraissées par passage de 24 h. dans l'alcool-éther, puis dans l'éther et soigneusement séchées à l'étuve.

Des pinces assez longues et dégraissées à l'alcool-éther;

Une pipette de Marcano de 0 cc. 250.

Réactifs.

1. Ether de pétrole;
2. Chloroforme;
3. Anydride acétique;
4. Acide sulfurique;
5. Solution de citrate de sodium 10%;
6. Solution Etalon de Cholestérol.

Préparer successivement :

Solution Standard Mère. — Un gramme de cholestérol dissous dans 100 centimètres cubes de chloroforme.

Un centimètre cube correspond à 0 gr. 01.

Solution Standard de Grigaut. — A 0 gr. 006 de cholestérol % soit 0 gr. 06 ‰. 6 centimètres cubes de la solution Standard Mère étendus à 1.000 centimètres cubes, avec du chloroforme,

donnent une solution, dont 1.000 centimètres cubes correspondent à 0 gr. 06 de cholestérol.

Cette solution étalon correspond à 1 gr. 50 de cholestérol ‰.

Solution Standard utilisée pour la micro-méthode à chaud. — Solution étalon de Grigaut diluée au 1/8.

La prise d'essai étant de 0 cc. 250, cette solution se comporte comme la solution étalon de Grigaut, correspondant à 1 gr. 50 de cholestérol %.

Ces étalons, ainsi préparés, doivent être conservés à la glacière.

Ils permettent une étude comparée de la méthode de Grigaut, et de la micro-méthode, avec extraction à chaud.

Technique. — I. Prélèvement. — Avec une pince bien nettoyée, disposer sur une boîte de Pétri, des rondelles de papier Chardin dégraissées, en les superposant trois par trois. Prélever le sang à l'oreille de l'homme ou du lapin, à l'aide d'une pipette de Marcano préalablement rincée avec la solution de citrate de sodium à 10‰.

Mesurer exactement jusqu'au trait, 0 cc. 250 de sang et laisser couler doucement la prise d'essai sur la pile des trois rondelles de papier.

Il y a intérêt à ne pas laisser couler le sang trop vite, à ne pas souffler trop fort et à utiliser un nombre suffisant de rondelles pour absorber la prise d'essai, afin qu'aucune trace de sang ne se répande sur le fond de la boîte, ce qui serait autant de causes d'erreur.

Prélever de même une autre prise d'essai.

Porter ensuite la boîte de Pétri à l'étuve (37°), jusqu'à ce que les rondelles soient bien sèches (3 h. au minimum).

2. Extraction. — a) *En vue d'extraire le cholestérol total* :

Placer dans un tube extérieur 5 centimètres cubes de chloroforme, c'est-à-dire jusqu'au premier trait de jauge.

b) *En vue d'extraire le cholestérol libre* :

Placer dans un tube extérieur 5 centimètres cubes d'éther de pétrole, c'est-à-dire jusqu'au premier trait de jauge.

Dans l'un et l'autre tube, faire glisser à l'aide d'une pince longue, fine et bien nettoyée, l'ensemble des rondelles imprégnées de 0 cc. 250 de sang.

Il y a avantage à les placer légèrement en biais, et à les enfoncer jusqu'au rétrécissement du tube. Surmonter chaque tube extérieur d'un tube intérieur à collerette. Placer les bouchons de caoutchouc munis des tubes de verre et plonger l'ensemble du système dans le B. M. préalablement chauffé au réchaud électrique jusqu'à 60° environ.

Etablir rapidement le courant d'eau froide.

L'éther de pétrole et le chloroforme se vaporisent à la chaleur du bain-marie, les vapeurs viennent imprégner les rondelles de papier, se condensent au niveau du réfrigérant et retombent sur le papier, en gouttes régulières, au milieu de la rondelle si celle-ci est convenablement placée, et grâce à la partie inférieure conique du réfrigérant. Les liquides d'épuisement descendent ensuite dans le fond du tube en entraînant le cholestérol.

L'éther de pétrole bouillant à une température plus basse que le chloroforme, l'épuisement commencera plus tôt.

Un certain jeu doit être ménagé entre le tube intérieur et le tube extérieur, comme l'indique le schéma (*fig.* 3) car une trop forte pression de vapeur soulève le tube intérieur, qui revient ensuite normalement en place. Si ce jeu n'est pas ménagé l'appareil risque d'éclater.

Au bout de quelques instants, la partie de l'appareil située au-dessus du bain-marie se recouvre de buée ; celle-ci provient de la condensation de la vapeur d'eau qui s'élève du bain-marie. Elle se condense sur les parois extérieures, et en particulier sur les bords de la collerette, et ruisselle ; ainsi, nous avons évité que des traces d'eau, même minimes, pénètrent dans le tube extérieur contenant le chloroforme.

Ce point est important, car toute trace d'eau produit, comme nous l'avons vu : soit une coloration jaune au cours de la coloration de Liebermann, coloration jaune qui nuit au dosage, soit un affaiblissement considérable de la couleur.

Grâce à ce petit artifice, nous n'avons jamais eu le moindre ennui à ce sujet.

Laisser ainsi l'épuisement se continuer pendant 25 à 30 minutes.

Arrêter ensuite le courant d'eau froide et retirer du bain-marie chaque appareil d'épuisement :

Dans le tube (*a*) *au chloroforme, il reste une solution chloroformique de cholestérol total*;

Dans le tube (*b*) *à l'éther de pétrole, il reste une solution de cholestérol libre dans l'éther de pétrole.*

Laisser au repos et refroidir le tube (*a*).

A l'aide d'une pince, retirer l'ensemble des rondelles épuisées par l'éther de pétrole (tube (*b*)) et correspondant à une prise d'essai de 0 cc. 250.

Les placer sur une boîte de Pétri et laisser s'évaporer l'éther de pétrole qui les imprègne encore.

Seul, reste sur les rondelles, le cholestérol estérifié, non épuisé.

Décanter l'éther de pétrole contenu dans la boule inférieure dans une capsule de porcelaine; rincer le tube à deux ou trois reprises avec de l'éther de pétrole ; joindre les liquides de lavage au contenu de la capsule et faire évaporer doucement au bain de sable.

Le résidu de la capsule (b) *correspond au cholestérol libre.*

c) *En vue de l'extraction du cholestérol estérifié.*

Après séchage, pratiquer sur les rondelles déjà épuisées à l'éther de pétrole, et sur lesquelles reste encore le cholestérol estérifié, un nouvel épuisement au chloroforme, suivant la technique déjà indiquée.

Le chloroforme extraira alors le cholestérol estérifié restant (*c*).

Après refroidissement à température de la pièce, il reste :

Dans le tube (*a*) *une solution chloroformique de cholestérol total.*

Dans la capsule (*b*), *un résidu de cholestérol libre.*

Dans le tube (*c*), *une solution chloroformique de cholestérol estérifié.*

3. Coloration. Dosage. — Reprendre le résidu (*b*) par 5 centimètres cubes de chloroforme.

Compléter les contenus des tubes (*a*) et (*c*) au trait de jauge de 5 centimètres cubes avec du chloroforme, et pratiquer la réaction de Liebermann par addition de 2 centimètres cubes d'anhydride acétique (jusqu'au deuxième trait de jauge du tube extérieur) et 0 cc. 2 d'acide sulfurique. Laisser en contact 10 à 15 minutes à l'obscurité et comparer au colorimètre

Calculs. — $\frac{E \times 1,5}{X}$ = q. en gr. %

E : hauteur de l'étalon.
X : hauteur de l'inconnu.

Avantages.

I. Ainsi modifiée et complétée, cette technique permet de séparer aisément :

le *cholestérol libre*,
et *le cholestérol estérifié.*

II. Les modifications apportées à l'appareil de Leiboff permettent une extraction rapide, ne nécessitant que peu de surveillance et offrant toute garantie.

En effet :

1° L'extraction n'entraîne aucune perte ;

2° Aucune trace d'eau ne peut pénétrer dans le système ;

3° La coloration, se faisant dans le tube même servant à l'extraction, évite toute perte pouvant se produire au cours d'un changement de tube.

III. Enfin, rappelons que 0 cc. 5 de sang total suffit pour déterminer :

Le cholestérol total,
Le cholestérol libre,
Le cholestérol estérifié.

RESULTATS

	Cholestérol total		Cholestérol libre		Cholestérol estérifié		Cholestérol total	
	Dosé		Dosé		Dosé		Calculé	
	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise
Chez l'homme	0,747	0,754	0,592	0,592	0,156	0,158	0,748	0,750
	5	5	4,50	4,50	0,535	0,535	5,035	5,035
	1,31	1,31	0,80	0,80	0,50	0,50	1,30	1,30
	1,13	1,13	0,83	0,83	0,28	0,28	1,11	1,11
	0,75	0,75	0,55	0,55	0,19	0,19	0,74	0,74
Chez le lapin	0,51	0,51	0,371	0,372	0,12	0 12	0,491	0,493
	0,80	0,78	0,76	0,74	illisible	illisible	0,76	0,74
	0,495	0,496	0,47	0,466	—	—	0,47	0,466
	0,717	0,711	0,62	0,63	-	-	0,62	0,63

L'examen de ce tableau montre que, pour des doses très faibles de cholestérol estérifié, le dosage n'a pas été possible; dans le cas du lapin normal en effet, la dose de cholestérol estérifié est seulement de quelques centigrammes; on conçoit qu'il soit impossible de l'évaluer directement. Mais, étant donnée la valeur du cholestérol libre, il est aisé de déduire la valeur du cholestérol estérifié, du cholestérol total.

Dans un cas d'expérimentation, si la teneur en cholestérol augmente, il est évident que le cholestérol estérifié pourra alors être évalué.

Les chiffres trouvés pour le cholestérol estérifié chez l'homme montrent la valeur de la technique; la valeur du cholestérol total dosé, et non calculé, servant en quelque sorte de vérification.

Alors même que nous poursuivions notre travail nous avons pris connaissance de l'article de Bernhard et Dreckter (3), nous nous sommes proposé de tenir compte des observations

de ces auteurs, et d'essayer de nous rendre compte si, comme ils l'annoncent, une extraction au mélange alcool-éther permet d'obtenir des valeurs de cholestérol plus élevées; car, prétendent-ils, l'extraction ainsi pratiquée est plus complète et plus rapide.

Nous avons essayé l'épuisement à chaud, d'une part au chloroforme, d'autre part, au mélange de Bernhard.

Extraction chloroformique

1re prise	2e prise
0,80	0,80
5	5

Extraction Alcool-éther (parties égales)

1re prise	2e prise
0,78	0,78
5,14	5,14

Ces résultats ne nous ayant pas paru présenter un gros intérêt, nous avons continué à pratiquer une extraction chloroformique.

Aussi satisfaisante et simple que soit cette technique, nous avons cherché encore plus simple; c'est pourquoi nous avons étudié ce que donnerait une extraction à froid.

b) Extraction a froid. — Ayant constaté que l'utilisation de la chaleur pouvait parfois produire une coloration jaune, qui rend la comparaison colorimétrique difficile sinon impossible, nous avons essayé de déterminer la valeur du cholestérol après extraction à température de la pièce, sans utilisation d'appareil d'extraction.

Des expériences préliminaires nous montrèrent que le chostérol est quantitativement extrait du sang desséché sur du papier filtre, par le chloroforme, pendant une durée de 2 h. à température de la pièce.

1. Bang, dans sa micro-méthode de dosage du cholestérol, utilise déjà l'action du solvant approprié sur la rondelle de papier imprégnée de sang, ceci à la température du laboratoire.

2. Reprenant cette idée, nous aidant des résultats obtenus par la technique à chaud, nous nous sommes proposé de mettre au point une technique d'extraction à froid, permettant de déterminer :

le cholestérol total;

le cholestérol libre;

le cholestérol estérifié.

Voici l'exposé de la technique, telle que nous l'avons utilisée :

Réactifs.

1. Chloroforme.

2. Ether de pétrole aussi pur que possible (Poulenc) température ébullition 50°-60°.

3. Solution Standard de cholestérol d'usage courant; préparée à partir de la solution standard mère.

Solution Standard mère. — Faire dissoudre 1 gr. de cholestérol, très exactement pesé, dans 100 centimètres cubes de chloroforme, dans un ballon très exactement jaugé (même solution mère que pour la préparation de la technique à chaud).

Solution Standard courante. — 5 centimètres cubes de la solution précédente sont étendus à 1.000 centimètres cubes avec du chloroforme.

1 centimètre cube de cette solution contient 0 mgr. 05 de cholestérol.

Ces deux solutions standard se conservent indéfiniment à la glacière.

4. Anhydride acétique.

5. Acide sulfurique concentré aussi pur que possible.

6 Solution de citrate de sodium 10 %.

Matériel.

1. Des flacons à large ouverture de verre d'environ 90 centimètres cubes bouchant à l'émeri.

2. Une pipette capillaire de Marcano, de 0 cc. 2, très exactement calibrée.

3. Des rondelles de papier filtre Chardin d'environ 1 cm.50 de diamètre, préalablement dégraissée à l'alcool et à l'alcool-éther, comme pour la micro-méthode à chaud décrite ci-dessus.

4. Un bain de sable
5. Un réchaud électrique

} déjà utilisés pour le dosage de la lipémie et pour la technique de dosage du chostérol à chaud.

6. Capsules de porcelaine.

7. Pinces fines et rigoureusement nettoyées à l'alcool-éther.

8. Des pipettes de 10 centimètres cubes exactement calibrées.

Technique.

1. Prélèvement. — A l'aide de la pipette de Marcano, préalablement rincée avec de la solution de citrate de sodium 10 %, prélever 0 cc. 2 de sang total, très exactement mesurés.

Le prélèvement se fait aisément à l'oreille ou au doigt chez l'homme, à l'oreille chez le lapin.

Déposer doucement ce sang sur trois rondelles de papier filtre superposées et placées à l'avance avec une pince sur une boîte de Pétri. Laisser le sang couler doucement en ayant soin de n'occasionner aucune perte, soit en soufflant, soit en n'utilisant qu'un nombre insuffisant de rondelles pour absorber le sang, qui se répandrait alors sur le fond de la boîte.

Prélever de même, et après rinçage de la pipette avec la solution citratée, une autre prise d'essai.

Les papiers imprégnés de sang sont mis à sécher à l'étuve (37°) pendant 30 minutes environ.

L'expérience nous a montré qu'un étuvage trop prolongé de 2 à 24 h. n'est pas sans inconvénient. En effet, l'extraction à froid est alors incomplète, c'est pourquoi il nous paraît utile d'insister sur la durée de 30 minutes. Incomplètement des-

séchées, les rondelles de papier filtre sont plus facilement épuisées par le solvant à froid.

2. Extraction. — A l'aide d'une pince fine, placer chaque ensemble de trois rondelles ayant absorbé 0 cc. 2 de sang, dans un flacon bouchant à l'émeri.

Dans le premier (*a*), ajouter 10 centimètres cubes exactement mesurés dans le chloroforme.

Dans le deuxième (*b*), ajouter 10 centimètres cubes d'éther de pétrole, boucher, agiter, laisser reposer 2 heures.

Pendant ce temps, le chloroforme extrait quantitativement le cholestérol total à partir du sang desséché ; l'éther de pétrole extrait le cholestérol libre seul soluble.

Après le repos de 2 heures, agiter et décanter le chloroforme du flacon (*a*) et le recueillir dans un flacon bouchant à l'émeri : (*Cholestérol total*).

Faire de même avec le flacon (*b*), mais en ayant soin de décanter l'éther de pétrole, dans une capsule ; rincer ensuite, et, par deux fois, le flacon (*b*) et les rondelles de papier avec du nouvel éther de pétrole ; joindre les liquides de lavage au contenu de la capsule ; faire ensuite évaporer à siccité, au bain de sable maintenu à douce température par le réchaud électrique.

Les rondelles restées dans le flacon (*b*), et qui contiennent encore le cholestérol estérifié, sont alors retirées à l'aide d'une pince soigneusement dégraissée, et placées à l'étuve quelques instants, afin d'évaporer les traces d'éther de pétrole qui subsistent. La température de la pièce suffit souvent à évaporer l'éther de pétrole restant.

Ces rondelles, séchées à nouveau, sont alors placées dans un flacon bouchant à l'émeri (*c*) identique aux premiers, dans lequel sont mesurés exactement 10 centimètres cubes de chloroforme. Ce chloroforme se charge alors de dissoudre le cholestérol restant (*Cholestérol estérifié*).

Après un repos de 2 heures, le chloroforme est décanté comme précédemment du flacon (*c*) dans un flacon bouchant à l'émeri.

De l'extraction il reste donc :

un liquide chloroformique (*a*) : *Cholestérol total.*

un résidu au fond d'une capsule (*b*) : *Cholestérol libre.*

un liquide chloroformique (*c*) : *Cholestérol estérifié.*

3. Coloration et Dosage. — Dans des tubes gradués en centimètres cubes et dixièmes de centimètres cubes, et généralement utilisés en vue de pratiquer le dosage de Grigaut :

Prélever très exactement :

1. 5 *centimètres cubes du liquide d'extraction* (*a*) : *Cholestérol total.*

2. 5 *centimètres cubes du liquide d'extraction* (*c*) : *Cholestérol estérifié.*

3. *Reprendre par exactement* 5 *centimètres cubes de Chloroforme*, le résidu contenu dans la capsule (*b*) correspondant au cholestérol libre. Placer ces 5 centimètres cubes de chloroforme dans un tube analogue : *Cholestérol libre.*

4. Mettre dans un tube semblable 5 centimètres cubes de la solution standard couramment utilisée, telle que 1 centimètre cube corresponde à 0 mgr. 05 de cholestérol.

Pratiquer ensuite, sur les quatre tubes, la réaction de Liebermann, en ajoutant dans chacun d'eux :

2 centimètres cubes d'anhydride acétique

et 0 cc., 2 d'acide sulfurique concentré.

Agiter, laisser en contact 15 minutes au frais et à l'obscurité.

Comparer ensuite au colorimètre.

Nota. — Il y a lieu de remarquer que le temps de contact ne doit pas excéder 15 minutes. La lecture au colorimètre doit être faite ensuite rapidement, car si la coloration verte apparaît vite, nous avons constaté qu'elle disparaît de même et que, 30 minutes après, les résultats ne sont plus lisibles

Calculs :

1. $\frac{\text{Lecture Etalon}}{\text{Lecture inconnu } (a)} \times 2{,}50 = x$ *gr. cholestérol total pour 1.000 centimètres cubes sang.*

2. $\frac{\text{Lecture Etalon}}{\text{Lecture inconnu } (c)} \times 2{,}50 = x'$ *gr. cholestérol estérifié pour 1.000 centimètres cubes sang.*

3. $\frac{\text{Lecture Etalon}}{\text{Lecture inconnu } (b)} \times \frac{2{,}50}{2} = x''$ *gr. cholestérol libre pour 1.000 centimètres cubes sang.*

En effet, en (*b*), nois avons utilisé la totalité du liquide d'extraction des 0 cc., 2 de sang, nous avons donc opéré sur concentration double, le résultat n'est en réalité que la moitié du chiffre trouvé.

Résultats. — En mettant sur pied cette technique, nous nous sommes demandé quelle était la durée d'extraction suffisante; nous avons donc pratiqué un certain nombre de prises d'essai; nous avons prélevé le liquide d'extraction toutes les demi-heures, et nous avons ensuite fait, pour chaque prise d'essai, le dosage de la teneur en cholestérol.

Ceci pour les deux solvants utilisés : *Chloroforme et Ether de pétrole.*

1er *cas. Etude sur le chloroforme.*

1 /2 h.	1 h.	1 h.1 /2	2 h.	2 h. 1 /2	3 h.
0,80	0,825	0,88	**1,085**	1,135	1,085

à la macro-méthode de Grigaut : cholestérol 1 gr. 15 ‰.

2e *cas. Etude simultanée sur le chloroforme et l'éther de pétrole.*

Chloroforme

1 /2 h.	1 h.	1 h. 1 /2	2 h.	2 h. 1 /2	3 h.
1,47	1,65	1,922	**2,08**	2,08	2,11

Ether de Pétrole

1 /2 h.	1 h.	1h. 1 /2	2 h.	2 h. /2	3 h.
0,52	0,54	0,595	**0,595**	0,595	0,595

à la macro-méthode Grigaut, cholestérol total = 2 gr. 4 ‰.
à la macro-méthode Kanner, cholestérol libre = 0 gr. 60 ‰.

3e *cas. Etude simultanée sur le chloroforme et l'éther de pétrole.*

Chloroforme

1 /2 h.	1 h.	1 h.1 /2	2 h.	2 h. 1 /2	3 h.
0,735	cassé	1,04	**1,135**	1,135	1,110

Ether de pétrole

1 /2 h.	1 h.	1 h. 1 /2	2 h.	2 h. 1 /2	3 h.
0,26	0,283	0,370	**0,370**	0,370	0,390

à la macro-méthode de Grigaut, cholestérol total = 1 gr.20 ‰.
à la macro-méthode de Kanner, cholestérol libre = 0 gr.375 ‰.

L'expérience montre que l'extraction du cholestérol libre dans l'éther de pétrole est plus rapide que celle du cholestérol total dans le Chloroforme. En effectuant de part et d'autre les prélèvements au bout de **2 h.**, les extractions respectives sont terminées. Cette technique nous a permis d'établir quelques chiffres chez l'homme et le lapin aussi bien dans les cas normaux que pathologiques et expérimentaux.

	Cholestérol total		Cholestérol libre		Cholestérol estérifié		Cholestérol total	
	Dosé		Dosé		Dosé		Calculé	
	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise	1re prise	2e prise
Chez l'homme	1,42	1,42	0,875	0,875	0,50	0,50	1,375	1,375
	1,12	1,12	0,84	0,84	0,29	0,29	1,13	1,13
	1,80	1,80	—	—	—	—	—	—
	0,725	0,725	0,54	0,54	0,18	0,18	0,72	0,72
Chez le lapin	3,40	3,40	1,17	1,17	2,34	2,34	3,51	3,51
	0,67	0,67	0,55	0,55	illisible	illisible	0,55	0,55
	4,625	4,625	2,50	2,50	3,57	3,57	6,07	6,07 a
	2,77		1,02	1,02	1,922	1,922	2,942	2,942 b
	2,60	2,60	0,77	0,77	1,785	1,785	2,555	2,555
	2,40	2,40	0,75	0,75	1,60	1,60	2,35	2,35

En examinant le tableau ci-dessus, on constate qu'en particulier dans le cas des lapins (*a*) et (*b*), la somme « cholestérol libre + cholestérol estérifié » est supérieure au chiffre trouvé pour le cholestérol total.

Tout laisse croire, qu'étant donné la forte teneur en cholestérol, l'extraction n'a pas été complète.

En effet les chiffres trouvés chaque fois pour la valeur du cholestérol par la macro-méthode de Grigaut (contrôle) correspondaient régulièrement avec la somme « cholestérol libre + cholestérol estérifié ».

Nous avons pensé qu'en augmentant la durée de l'extraction dans des cas analogues, nous obtiendrions une extraction plus complète.

Lapin b.

Epuisement :	2 H.	3 H.	24 H.
	2,33	2,50	2,77

Lapin c.

Epuisement :	2 H.	3 H.	28 H.
	2,47	2,47	2,60

Lapin d.

Epuisement :	2 H.	3 H.	24 H.	27 H.
	2,33	2,35	2,42	2,40

Nous constatons qu'après même 27 h. l'épuisement n'est pas complet.

Mais, la somme de *cholestérol libre + cholestérol estérifié*, nous a toujours donné des résultats excellents; aussi, nous ne saurions trop recommander cette méthode qui, tout en nous donnant un rapport considéré comme de plus en plus utile, en physiologie expérimentale et en clinique, assure une extraction plus complète.

C. Alors même que nous poursuivions la mise au point de la méthode d'extraction à froid, Jonas, Kamlet et Brooklyn (29) (mai 1934), publièrent une méthode analogue, en vue de l'extraction du seul *cholestérol total.*

Nous ne voyons là qu'une confirmation de l'intérêt de cette méthode, qui, plus étendue que celle préconisée par les auteurs précités, peut, le croyons-nous, satisfaire les besoins d'une expérimentation suivie.

Ayant fait une étude comparative des deux techniques d'extraction, à chaud et à froid, il nous a paru intéressant de rapporter les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous :

Extraction à chaud						Extraction à froid					
Cholestérol total (dosé)		Cholestérol libre		Cholestérol estérifié		Cholestérol total (dosé)		Cholestérol libre		Cholestérol estérifié	
1,43	1,44	—	—	—	—	1,47	1,47	—	—	—	—
1,31	1,31	0,80	0,80	0,50	0,50	1,42	1,42	0,875	0,875	0,50	0,50
1,13	1,13	0,83	0,83	0,28	0,28	1,12	1,12	0,84	0,84	0,29	0,29
0,75	0,75	0,55	0,55	0,19	0,19	0,725	0,725	0,54	0,54	0,18	0,18

CONCLUSIONS

Conformément au but que nous nous étions proposé, nous avons vérifié ou mis au point :

I. Une méthode de dosage des acides gras du sang

Méthode acidimétrique de Himwich-Friedman et Spiers

Utilisant 1 centimètre cube de plasma.
Rapide, puisqu'elle peut être pratiquée en 2 heures.
Précise, à faible coefficient d'erreur.
Permettant des dosages en série.

II. Deux micro-méthodes de dosage du cholesterol du sang

permettant d'évaluer :

le Cholestérol *Total*
» » *Libre*
» » *Estérifié*

A. *Micro-Méthode d'Extraction à chaud*

Utilisant 0 cc. 250 de sang total.
Relativement rapide.
Les dosages en série sont aisément pratiqués.

B. *Micro-Méthode d'Extraction à froid*

Utilisant 0 cc. 200 de sang total.
Rapide.
Demandant peu de matériel et de manipulations.
Permettant les dosages en série.

Ces deux techniques nous ont donné entière satisfaction et nous ne saurions trop les recommander dans un but d'étude expérimentale ; les résultats consignés dans le tableau comparatif de la page précédente le montrent suffisamment.

Cependant, dans les cas de teneur élevée en cholestérol, nous conseillons seulement d'utiliser, pour la technique d'extraction à froid, la somme « cholestérol libre - cholestérol estérifié » pour obtenir le cholestérol Total ; inconvénient qui ne nous est jamais apparu avec la technique d'extraction à chaud.

Vu :
Le Doyen,
Pierre MAURIAC.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
Pierre MAURIAC.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 24 novembre 1934.
Le Recteur de l'Académie,
A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

Nous ne mentionnons ici que la bibliographique que nous avons consultée.

Chaque référence précédée de (B) comporte une bibliographie importante.

1. **Allardyce**. — « Dosage du cholestérol sanguin », *Journ. of Research*, 1930, t. III, p. 115.
2. **Bang**. — « Die Mikrobestimmung der Blutlipoïde », *Bioch. Zeitsch*, 1918, t. XCI, p. 234
3. **Bernhard**, **Dreekter**. — « Méthode simple et précise de dosage du cholestérol dans le sérum et le plasma », *Journ. of Labor. and Clinical Med.*, 1930-1931, t. XVI, p. 1225.
4. **Bloor**. — *In Annual Review of Biochemistry : Fat. Metabolism*, 1931.
5. **Bloor**, **Pelkan**, **Allen**. — « Determination of Fatty Acids (and cholesterol) in small amounts of blood plasma », *J. of. Biol. Chem.*, 1922, t. LII, p. 191.
6. **Boyed**. — « A differential lipid analysis of Blood plasma in normal young women by micro-oxidative methods », *J. of Biol. Chem.*, t. CI, p. 323.
7. **Bufano**. — *La Fisiopathologia clinica esperimentale de la lipémia*, Inst. Edition scientifique, 1929.

(B) 8. **Bugnard** et **Soula**. — « Le cholestérol, son taux et la régulation de sa constance », *M. Méd.*, n° 76, 23 septembre 1931.

9. **Caminade**. — « Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, t. IV, p. 601.
10. **Condorelli**. — « Microméthode pour la détermination qualitative et quantitative des graisses du sang », *Riforma Medica*, 1930.
11. **Day** et **Bolliger**. — « Une méthode simple pour la détermination du cholestérol dans le sang », *Australian J. Exptal. Bio. Med. Scien.*, 1930, t. VII, p. 41-44.
12. **De Toni**. — « The colorimetric estimation of cholesterol and lecithin in Blood in connection with Folin and Wu's system of Blood analysis », *J. of Biol. Chem.*, 1926, t. LXX, p. 207.
13. **Douris**. — « Techniques de Grigaut et Zizine : lecithines dans le sang », *Guide pratique pour l'analyse du sang*, Vigot frères, 1925.
14. **Ducuing** et **Soula**. — *R. C. Soc. Biol.*, t. XCI, p. 1397.

15. **Durupt**. — *Microméthodes et semi-microméthodes appliquées aux analyses chimiques du sang et des humeurs : Dosages des acides gras, volumétrique et néphélométrique*, 1930.
16. **Fauque** et **Manceau**. — « Dosage des lipoïdes dans le sang des hépatiques et des diabétiques, leurs modifications sous l'influence de la cure hydrominérale de Vichy », *Archives de médecine et de pharmacie militaires*, juin 1933, p. 769.
17. **Girard**. — « La chimie des hormones sexuelles », *Conférence Bull. Soc. chim. Biol.*, 1933, p. 562.
18. **Griffon**. — « Contribution à l'étude du mécanisme de la réaction de Liebermann pour le cholestérol », *C. R. Soc. Biol.*, 1931, t. CVII, p. 943.
19. **Grigaut**. — Thèse de Paris, 1913.
20. **Grigaut**. — « Adaptation de la méthode calorimétrique au dosage du cholestérol libre dans le sérum sanguin », *Soc. de Biol.* 1933, t. CXII, p. 34.
21. **Grigaut** et **Laroche** (G.). — *Presse Médicale*, 22 septembre 1934.
22. **Grimbert**, **Laudat** et **Weil**. — « Dosage des lipoïdes dans le sérum sanguin », *C. R. Soc. Biol.*, 1913, t. XIV, p. 898.
23. **Gruber**. — *Lipoïdes*, thèse de Paris, 1927.
24. **Harnes**. — « The colorimetrique determination of Lipoïd phosphorus in Blood », *J. of. biol. chem.*, 1928, t. LXXVII, p. 405.
25. **Himwich**, **Friedman**, **Spiers**. — « A. modification of the method of Stewart and white for the determination of Blood — fat with observations on several species, in postabsorptive conditions », *Bioch. Jour.*, 1931, t. XXV, p. 1839.
26. **Horinchi**. — « Teneurdu sang de lapin en substances grasses et lipoïtiques », *J. of biol. chem.*, 1920, t. XLIV, p. 348 et 349.
27. **Hueck** et **Wacker**. — « Uber die Beziehungen des cholesterins zum intermediären Fettstoffwechsel », *Biol. Zeitschr.*, 1919, t. C, p. 86.
28. **Iscovesco**. — « Les lipoïdes », *Presse Médicale*, 1922, t. II, p. 653.
29. **Hamlet** and **Brooklyn**. — « Microméthode simplifiée de dosage du cholestérol dans le sang total, sérum, plasma », *Journal of. Lab. and clinical med.*, may 1934, n° 8.
30. **Hanner**. — « Détermination colorimétrique du cholestérol libre et total du sang », *Archives de l'Institut prophylactique*, 3e trimestre, 1932, t. IV, n° 3.
31. **Hanner** et **Chancogne**. — « « Etude comparative de la méthode de Kanner et du procédé de Grigaud pour le dosage de la cholestérine libre du sérum », *Soc. de Biol.*, 1933, t. CXIII, p. 57.
32. **Katsura** und **Hatakeyama**. — « Eine genaue titrimetrische Bestimmungsmethode für Gesamtfettsäuren und Gesancholesterin des Blutes in sehr kleinen Mengen », *Bioch. Zeitschr.*, 1931, t. CCXXXIV, p. 462-477.

(B) 33. **Khalyl**. — *Le Cholestérol*, thèse de Beyrouth, 1933. *Résumé dans les annales de la Faculté de Beyrouth*, novembre 1932, p. 365.
34. **Krastelewsky**. — « Zur methodik der kolorimetrischen quantitativen Bestimmung des Cholesterins im Blutserum », *Bioch. Zeitschr.*, 1923, t. CXLIII, p. 403, 407.
35. **Laborde** et **Enver**. — « Dosage des lipoïdes de la poudre de glandes thyroïdes », *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1931, t. XIII, p. 148.
36. **Laborde** et **Enver**. — « Modifications apportées à la méthode de Kumagava Suto, pour le dosage des lipoïdes des organes », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, t. XIII, p. 712.
37. **Leiboff**. — « A. Simplified method for cholesterol determination in Blood », *J. of. Biol. chem.*, 1924, t. LXI, p. 77.
38. **Lemaire**. — *Cholestérine*, thèse de médecine de Paris, 1928.
(B) 39. **Leuret** et **Dutrenit**. — *Le Cholestérol*, Baillière, Paris, 1934.
40. **Ling**. — « The determination of cholesterol in small amounts of Blood », *Journ. of. Biol. chem.*, 1928, t. LXXVI, p. 361.
41. **Machebœuf**. — *Thèse*, Paris, 1927.
42. **Machebœuf**. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, t. II, p. 268 et 485.
43. **Machebœuf** et **Sandor**. — *C. R. A. S.*, 1932, t. CXCIV, p. 1102.
44. **Machebœuf**, **Sandor** et **Whal**. — « Recherche sur la néphrose lipoïdique, 2e mémoire : Etude qualitative des lipides et des diverses fractions lipidiques du sérum sanguin », *Bull. Soc. Chimie Biol.*, t. I, p. 504.
45. **Malmy**. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, décembre 1933.
46. **Man** and **Gildea**. — « « A modification of the Stoddard and Drury titrimetric method for the determination of the fatty acids in Blood », *Journ. Biol. chem.*, 9132, t. IC, p. 43.
47. **Maronne**. — *Métabolisme normal et pathologique des graisses*, thèse de Paris, 1931.
48. **Mauriac**. — « Les variations de cholestérolémie et leurs significations », extrait du *Liége Médical*, nº 36-37, septembre 1934.
49. **Monceaux**. — « La Carotinémie des tuberculeux; ses rapports avec l'hypercholestérolémie », *P. Méd.*, 1927, p. 7186; *C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 1064.
50. **Mueller**. — « Comparaison des résultats obtenus entre le dosage colorimétrique et pondéral du cholestérol. », *Journ. Biol. chem.*, 1916, t. XXV, p. 549.
51. **Myers** et **Wardel**. — *Journ. Biol. Chem.*, t. XXXVI, p. 147.
52. **Obermeyer** and **Milton**. — « Micro-photometric method for the determination of free cholesterol and cholesterol esters in Blood plasma », *Bioch. Journ.*, 1933, t. XXVII, p. 345.
53. **Okey**. — « A micro-method for the estimation of cholesterol by oxidation of the digitonide », *Journ. Biol. Chem.*, 1930, t. LXXXVIII, p. 367.

54. **Osato**. — **Heki**. — « On the micro determination of Lipids in tissues », *J. Biol. Chem.*, 1930, t. LXXXVII, p. 541.
55. **Pecker**. — « Lipémies et Lipuries », *J. P. C.*, 1931.
(B) 56. **Peter** et **van Slyke**. — *Quantitative clinical Chemistry*, Williams Wilkins, Baltimore, 1932.
57. **Rappaport** und **Engelberg**. — « Eine mikromethode zur Bestimmung des Blutfettes », *Klinische Woch*, 1932, t. II, p. 1080.
58. **Remond Cauquil** et **Soula**. — *Bull. de l'Ac. de médecine*, t. C, n° 28, p. 825.
59. **Shopes**. — « Difference in serum and plasma content of Cholesterol Ester », *J. Biol. Chem.*, 1928, t. LXXX, p. 125.
60. **Tamches**. — *Lécithine et Cholestérine*, thèse, Paris, 1926.
61. **Tannhauser**. — *Tratado del metabolismo y de las Enfermedades de la Nutricion*, Madrid, 1934.
62. **Thomas**. — *Cours de Chimie biologique*, Presses Universitaires de France, 1926, 1929.
63. **Velluz**. — « « Sur la détermination simple du rapport esters du Cholestérol, Cholestérol total », *C. R. Soc. Biol.*, 1933, t. 112, p. 255.
64. **Velluz**. — « Constitution et activité des carbures synthétiques, agents de cancérisation expérimentale », *J. P. C.*, 1934, t. XIX, p. 77.
65. **Vitte**. — Thèse de Bordeaux, 1930.
66. **Vitte** et **Leuret** (E.). — « Le taux du cholestérol des tuberculeux pulmonaires », *Bul. Société de Biologie de Bordeaux*, 1930.
67. **Whàl**. — *Néphroses lipoïdiques*, thèse de Paris, 1929.
68. **Yasuda** et **Bloor**. — « Lipides content of Tumor », *Journ. of. clinival investigation*, 1932, t. II, p. 679.
69. **Zechmeister**. — « Les Caroténoïdes, leurs rapports avec d'autres composés naturels et leur importance biologique », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, t. XIV, p. 993.

Bordeaux. — Imp. J. Bière, 18, rue du Peugue. — 1934